

Abstract of DE10258971

Use of astaxanthin (I)-containing plants of the genus *Tagetes* or their parts, or (I)-containing extracts of them, for oral administration to animals. Independent claims are also included for the following: (1) preparation of an animal feed composition by mixing standard fodder ingredients with (I)-containing plants of the genus *Tagetes* or their parts, or (I)-containing extracts of them; (2) method for pigmentation of animals, or their products, by oral administration of (I)-containing plants of the genus *Tagetes* or their parts, or (I)-containing extracts of them; and (3) animal feed composition or pigmentation agent that contains (I)-containing plants of the genus *Tagetes* or their parts, or (I)-containing extracts of them.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 58 971 A1 2004.07.01

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 58 971.2
(22) Anmeldetag: 16.12.2002
(43) Offenlegungstag: 01.07.2004

(51) Int Cl.⁷: **A23K 1/14**
C12N 15/00, A01H 5/00

(71) Anmelder:
SunGene GmbH & Co. KGaA, 06466 Gatersleben,
DE

(72) Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfütterzubereitungen, die Tierfütterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

RETO1... 100
284782... 100
RETO1... 200
284782... 200
RETO1... 300
284782... 300
RETO1... 400
284782... 400
RETO1... 500
284782... 500
RETO1... 600
284782... 600
RETO1... 700
284782... 700
RETO1... 800
284782... 800
RETO1... 900
284782... 900
RETO1... 990
284782... 990

Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.
- [0002] Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpzucht verwendet.
- [0003] Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliches Astaxanthin wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.
- [0004] Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabilisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikationsbereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.
- [0005] WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtyppflanze der Spezies *Adonis aestivalis*. Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis aestivalis* sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung von Fischen.
- [0006] Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an astaxanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhalten werden kann. Dies führt zu hohen Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.
- [0007] Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.
- [0008] Demgemäß wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.
- [0009] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.
- [0010] Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung *Tagetes* werden bevorzugt Pflanzen der Gattung *Tagetes* verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fettsäure-Di- oder Monoester vorliegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.
- [0011] Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung *Tagetes* werden vorzugsweise Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.
- [0012] Wildtyppflanzen der Gattung *Tagetes* weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäß gefunden, dass die Pflanzen der Gattung *Tagetes* beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.
- [0013] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung *Tagetes* beispielsweise dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* im Vergleich zum Wildtyp eine Ketolase-Aktivität verursacht wird.
- [0014] Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.
- [0015] Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.
- [0016] Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.
- [0017] Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.
- [0018] Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes* verstanden.
- [0019] Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) der Gattung *Tagetes* oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* oder beides verstan-

den werden.

[0020] Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

[0021] Diese Referenzpflanze der Gattung *Tagetes* ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*, ganz besonders bevorzugt *Tagetes erecta* L., Accession number: TAG 72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

[0022] Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128–6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumchoolat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

[0023] Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren.

[0024] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung *Tagetes* durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

[0025] In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes*.

[0026] Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

[0027] Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

[0028] Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

[0029] Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

Haematococcus pluvialis, insbesondere aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematococcus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Alicigines spec. (Accession NOD58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

Nostoc punctiforme ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP_00111258 (SEQ ID NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

Nostoc punctiforme ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

Synechococcus sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725–1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert), oder

Brevundimonas aurantiaca (WO 02079395).

[0030] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

[0031] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ

ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0032] Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

[0033] Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

[0034] Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

[0035] Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

[0036] Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

[0037] Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

(viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

(ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (moderate Bedingungen).

(2) Waschschrill für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

(iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

(vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0039] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0040] In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0041] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispiels-

weise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0042] Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

[0043] Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

[0044] Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

[0045] Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

[0046] Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

[0047] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0048] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung *Tagetes* leicht ermitteln.

[0049] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

[0050] In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

[0051] Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0052] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0053] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze der Gattung *Tagetes* eingebracht.

[0054] Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* als Ausgangspflanzen oder erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

[0055] In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes* verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0056] Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

[0057] Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, ge-

gebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

[0058] Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

[0059] Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

[0060] Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

[0061] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

[0062] Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

[0063] Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

[0064] Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.

[0065] Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.

[0066] Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. die gebildete Menge β -Carotin erhöht.

[0067] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

[0068] Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) in vitro bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

[0069] Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

[0070] Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) in vitro bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

[0071] Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

[0072] Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

[0073] Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege

erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

[0074] Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze der Gattung *Tagetes*.

[0075] Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung *Tagetes* eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden.

[0076] Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

[0077] Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

[0078] Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

[0079] Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96106166 beschrieben.

[0080] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze der Gattung *Tagetes*.

[0081] Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase codiert, verwendet werden.

[0082] Bei genomischen Hydroxylase-bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

[0083] Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

[0084] Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, codierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20).

[0085] In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen vor.

[0086] In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase auf.

[0087] Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70 %, noch bevorzugt mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

[0088] Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO: 18 leicht auffinden.

[0089] Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0090] In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Akti-

vität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

[0091] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0092] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

[0093] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

[0094] Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

[0095] Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

[0096] Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0097] In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

[0098] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0099] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

[0100] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

[0101] Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0102] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der Gattung Tagesges gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität auf.

[0103] Unter ϵ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ϵ -Cyclase verstanden.

[0104] Unter einer ϵ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ϵ -ionon-Ring zu überführen.

[0105] Unter einer ϵ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ -Carotin umzuwandeln.

[0106] Dementsprechend wird unter ϵ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ -Carotin verstanden.

[0107] Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

[0108] Unter einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ϵ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

[0109] Die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge, oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsge-

mäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

[0110] Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

[0111] Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) in vitro bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben werden.

[0112] Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.09 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unlöslich vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

[0113] Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

[0114] Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-dsRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein ϵ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein ϵ -Cyclase-Gen-Transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem ϵ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes ϵ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen ϵ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

[0115] Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer ϵ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer ϵ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte

Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der ϵ -Cyclase, des Transports der ϵ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines ϵ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

[0116] Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

a) Einbringen einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz (ϵ -Cyclase-dsRNA)

[0117] Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99132619; WO 99153050; WO 00/68374; WO 00144914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

[0118] Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

[0119] Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

[0120] Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0121] Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0122] Unter dem Begriff " ϵ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

[0123] Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkripts der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

[0124] Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

[0125] In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

[0126] Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-dsRNA Teile des ϵ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

[0127] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ϵ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkripts geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

[0128] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer ϵ -Cyclase bewirken.

[0129] Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsR-

NA) umfasst dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

[0130] Zur Transformation der Pflanze mit einer ϵ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die ϵ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

[0131] Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

[0132] Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

[0133] In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

[0134] "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der ϵ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines ϵ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines ϵ -Cyclase-Gens.

[0135] Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem ϵ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der ϵ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der ϵ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ϵ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von ϵ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

[0136] Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines ϵ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

[0137] "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

[0138] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ϵ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementären ist.

[0139] Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

[0140] Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ϵ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

[0141] Zur Herstellung der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase
 SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase
 SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase
 SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors
 SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

[0142] Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

[0143] Die doppelsirängige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder – bevorzugt – ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

[0144] Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Van canneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

[0145] Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

[0146] Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer ϵ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

[0147] Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kointegration der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

[0148] Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

[0149] Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

[0150] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenesspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

[0151] Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

[0152] Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizientere Verminderung bewirken.

b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-antisenseRNA)

[0153] Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach – auch in Pflanzen – beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu vermindende ϵ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der ϵ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder – im Fall von genomischer DNA – durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

[0154] Eine ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese ϵ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der ϵ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die ϵ -Cyclase umfasst. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. ϵ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..

[0155] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

[0156] Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

[0157] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer ϵ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines ϵ -Cyclase-Gens (z.B. einem ϵ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triplehelikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des ϵ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) *Anticancer Drug Res* 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) *Ann NY Acad Sci* 660:27-36; Maher LJ (1992) *Bioassays* 14(12):807-815).

[0158] In einer weiteren Ausführungsform kann die ϵ -Cyclase-antisenseRNA eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, – im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren – die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641).

c) Einbringen einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

[0159] Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) *Nature* 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet* 250(3):329-338).

[0160] Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindernenden ϵ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet* 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, *Methods in Cell Biology* 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) *Mol Gen Genet* 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden ϵ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) *Science* 261:1411-1418).

d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -CyclasesenseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

[0161] Die Expression einer ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Ori-

entierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden ϵ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen ϵ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) *Plant Mol Biol* 31(5):957-973; Goring et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1770-1774; Smith et al. (1990) *Mol Gen Genet* 224:447-481; Napoli et al. (1990) *Plant Cell* 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) *Plant Cell* 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) *Plant Cell* 2:279-289; in US 5,034,323).

[0162] Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

[0163] Bevorzugt ist die ϵ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der ϵ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen ϵ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

[0164] Eine Verminderung einer ϵ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) *J Biol Chem* 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) *J Mol Biol* 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) *J Biol Chem* 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) *Curr Opin Chem Biol* 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) *J Biol Chem* 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):3616-3620; Klug A (1999) *J Mol Biol* 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) *Adv Drug Deliv Rev* 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) *Int J Biochem Cell Biol* 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) *J Biol Chem* 275(43):33850-33860).

[0165] Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines ϵ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

[0166] Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die ϵ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) *Curr Top Microbiol Immunol* 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) *Biotechnology (NY)* 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8(4):411-416; Whitelam (1996) *Trend Plant Sci* 1:286-272).

f) Einbringen von den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

[0167] Die ϵ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen ϵ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angelt SM et al. (1999) *Plant J* 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme – auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet – bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu vermindernenden ϵ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann – vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren – abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) *Plant J* 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) *Plant Mol Biol* 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) *Plant Cell* 10(6):937-46).

[0168] Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1.

g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an ϵ -Cyclase-Genen

[0169] Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster

etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

[0170] Die Verminderung der ϵ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines ϵ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das ϵ -Cyclase-Gen so verändert wird, dass die Funktionalität des ϵ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des ϵ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des ϵ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten ϵ -Cyclase selektioniert.

[0171] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruchs und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny)l]butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00126192, WO 00129384, WO 00/32579, WO 00164878, WO 00168206, WO 00167734, WO 01123386 und WO 01123390 beschriebenen Substanzen.

[0172] Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

[0173] Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

[0174] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährende Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährende Expressionskassette in Pflanzen.

[0175] In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährende Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

[0176] In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase aufweisen.

[0177] Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

[0178] In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

[0179] Besonders bevorzugt werden die genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* mit folgender Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,
genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0180] Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

[0181] Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen der Gattung *Tagetes* mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder ϵ -Cyclase-Inverted-Repaet-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

[0182] Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0183] Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

[0184] Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0185] Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0186] Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung *Tagetes* und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes*, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* selbst beschrieben.

[0187] Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targe-

ting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987); 8693-8711).

[0188] Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

[0189] "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

[0190] Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

[0191] Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91113991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

[0192] Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93121334) können ebenfalls verwendet werden.

[0193] Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96112814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

[0194] Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

[0195] Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

[0196] Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

[0197] Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

[0198] Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Pro-

motor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

[0199] Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97105900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EM-BO J 8:2445-2451).

[0200] Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92116635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98122593) oder der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 1).

[0201] Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

[0202] Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

[0203] Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

[0204] Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

[0205] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

[0206] Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

[0207] Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

[0208] Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Nicotiana tabacum Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

[0209] Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGATCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGATCC_BamHI

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
 TACTCCTTCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTGTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-
 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAACTGAGACTGCGGGGATCC_BamHI

[0210] Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

[0211] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

[0212] Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen der Gattung *Tagetes* bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

[0213] Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

[0214] Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

[0215] Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, N, de Greve, N, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

[0216] Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

[0217] Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

[0218] Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 {1984}, 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

[0219] Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

[0220] Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

[0221] Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.

[0222] Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 {1984}, 8711)

oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

[0223] Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0224] Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0225] Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

[0226] Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

[0227] Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJ1T117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

[0228] Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

[0229] Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* weisen im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

[0230] Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltiger Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere.

[0231] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

[0232] Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extraktion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzubereiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern, wobei die Reihenfolge beliebig ist.

[0233] Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-ether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

[0234] Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auftrennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Astaxanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

[0235] Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farbton.

[0236] Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatriidae.

- [0237] Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.
- [0238] Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.
- [0239] Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.
- [0240] Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.
- [0241] Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.
- [0242] Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale Verabreichung von Tierfutterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.
- [0243] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht.
- [0244] Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfutterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Biovertügbarekeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- [0245] Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.
- [0246] Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.
- [0247] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.
- [0248] Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.
- [0249] Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beigemischt werden.
- [0250] Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.
- [0251] Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.
- [0252] Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.
- [0253] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.
- [0254] Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- [0255] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.
- [0256] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- [0257] Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fischfutterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine, Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.
- [0258] Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Gew.-%	Einwaage f. 500 kg
		kg
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

[0259] Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Gew.-%
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

[0260] In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

[0261] Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter beispielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.

[0262] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.

[0263] Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions- und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (post pelleting application).

[0264] In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.

[0265] Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder

die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.

[0266] Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

[0267] Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

[0268] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

[0269] Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

[0270] Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

[0271] Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

[0272] Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

[0273] Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

[0274] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

[0275] Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

[0276] In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

[0277] Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen.

[0278] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

[0279] Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch oralen Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

[0280] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

[0281] Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

[0282] Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel I

Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes

[0283] Allgemeine Experimentelle Bedingungen:

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

[0284] Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel I.1:

[0285] Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

[0286] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

[0287] Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

[0288] Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

[0289] Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

[0290] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

[0291] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0292] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

[0293] Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abb. 1 und 2, Sequenzvergleiche).

[0294] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Haematococcus pluvialis Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

Beispiel I.2:

[0295] Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

[0296] Die cDNA, die für die Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus Haematococcus pluvialis Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

[0297] Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0298] Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

[0299] Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus Haematococcus pluvialis unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

[0300] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer Haematococcus pluvialis cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

[0301] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0302] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

[0303] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0304] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Haematococcus pluvialis Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

Beispiel I.3:

[0305] Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.

[0306] Die cDNA, die für die Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) bestehend aus der ge-

samen Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide 1 bis 39).

[0307] Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

[0308] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0309] Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

[0310] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0311] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0312] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

[0313] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0314] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligation mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

Beispiel 1.4:

[0315] Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc* sp. PCC 7120 codiert

[0316] Die DNA, die für die Ketolase aus Nostoc PCC 7120 kodiert, wurde mittels PCR aus Nostoc PCC 7120 (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

[0317] Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von Nostoc PCC 7120, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO₃, 0.04 g/l K₂PO₄ × 3H₂O, 0.075 g/l MgSO₄ × H₂O, 0.036 g/l CaCl₂ × 2H₂O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na₂CO₃, 1ml trace metal mix AS + Co (2.86 g/l H₃BO₃, 1.81 g/l MnCl₂ × 4H₂O, 0.222 g/l ZnSO₄ × 7H₂O, 0.39 g/l NaMoO₄ × 2H₂O, 0.079 g/l CuSO₄ × 5H₂O, 0.0494 g/l Co(NO₃)₂ × 6H₂O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

[0318] Protokoll für DNA Isolation aus Nostoc PCC7120:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

[0319] Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus Nostoc PCC 7120, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus Nostoc PCC 7120 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.

[0320] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer Nostoc PCC 7120 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

[0321] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

[0322] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

[0323] Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten Nostoc PCC 7120.

[0324] Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von Nostoc in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

[0325] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

[0326] Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (W002/00900).

[0327] Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 3**, Konstruktkarte). In der **Abb. 3** beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

[0328] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

[0329] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

[0330] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0331] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0332] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

[0333] Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0334] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34)

und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0335] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0336] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0337] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95 °C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40 °C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9 Amplifikat
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

[0338] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30 °C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl gA7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0339] Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

[0340] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0341] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP + Reductase" annotiert.

[0354] Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0355] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 by SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

[0356] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 by SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

[0357] Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0358] Zur Herstellung des Tagetes-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abb. 5, Konstruktkarte). In der Abb. 5 beinhaltet Fragment FNR Promotor den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment rbcS Transit Peptid das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment Nost Ketolase (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S Terminator (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 1.5C:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der Nostoc sp. PCC 7120 Ketolase in Tagetes erecta.

[0359] Die Expression der Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus Arabidopsis thaliana (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

[0360] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus Arabidopsis thaliana beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus Arabidopsis thaliana isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

[0361] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus A.thaliana
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0362] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute

1X	72°C	10 Minuten
----	------	------------

[0363] Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

[0364] Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet.

det. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0365] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

[0366] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0367] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0368] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

[0369] Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0370] Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

[0371] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0372] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute

50°C 1 Minute
 72°C 1 Minute
 1X 72°C 10 Minuten

[0373] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0374] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligation in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PNOST.

[0375] Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0376] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PNOST wurde das 2.6 KB by SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abb. 6, Konstruktkarte). In der Abb. 6 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.6:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

[0377] Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28_C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

[0378] Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

[0379] Ein beliebiger Agrobacterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat × 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28 C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

[0380] Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benrylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m² × sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in

einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

[0381] Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA_3 , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

[0382] Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von $AgNO_3$ (3-10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

[0383] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.

Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

Beispiel I.8

[0384] Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel I.8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

[0385] Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

[0386] Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254-Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

[0387] Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

[0388] Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich:

Beispiel I.9

Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

Allgemeine Arbeitsvorschrift

[0389] Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0,75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5

bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterol-Esterase (Stamm-lösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 1 Stunden wird nochmals 100 bis 200 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0,35 g Na₂SO₄ × 10H₂O und 500 ml Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na₂SO₄ × 10H₂O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blü-tenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

[0390] Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blü-tenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

[0391] Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Frag-ment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

[0392] Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

[0393] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0394] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0395] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvek-tor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

[0396] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0397] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 ml Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0398] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94_C 2 Minuten
 35X 94_C 1 Minute
 50_C 2 Minuten
 72_C 3 Minuten
 1X 72_C 10 Minuten

[0399] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9
- 0.25 mg A8/10

[0400] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0401] Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

[0402] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0403] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94_C 2 Minuten
 35X 94_C 1 Minute
 50_C 1 Minuten
 72_C 1 Minuten
 1X 72_C 10 Minuten

[0404] Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz

AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0405] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

[0406] Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

[0407] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0408] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0409] Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

[0410] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

[0411] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heisst pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenesspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

[0412] In der Abb. 7 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment Intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenesspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

[0413] Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 by Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 by 5'Nichttranslatierter Sequenz (5'UTR) und 297 by der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

[0414] Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 111000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtem-

peratur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

[0415] Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0416] Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 by Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0417] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	58_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0418] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

[0419] Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1.10) verwendet.

[0420] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

[0421] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 by 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

[0422] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

[0423] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 by SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ur-

sprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

[0424] Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0425] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 by SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 8**, Konstruktkarte).

[0426] In der **Abb. 8** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment Intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0427] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 by SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 9**, Konstruktkarte).

[0428] In der **Abb. 9** beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

[0429] Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 by 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 by der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

[0430] Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

[0431] Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

[0432] Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 by Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0433] Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 by Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0434] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	58_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0435] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

[0436] Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

[0437] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

[0438] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 by 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

[0439] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 by SacI-XhoI Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 10**, Konstruktkarte).

[0440] In der **Abb. 10** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.13

Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

[0441] Ein 199 by Fragment bzw. das 312 by Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

[0442] Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 ug genomische DNA in einem 25 ul Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 ml verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 by der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 by des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 by des 5'terminale Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe **Abb. 11**).

[0443] Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0444] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0445] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (**Abb. 11**).

[0446] Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

[0447] Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

[0448] Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.2 mM jedes dNTPs
- 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

[0449] Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 93_C: 1 Minute, 95_C: 1 Minute

5X 94_C: 30 Sekunden, 62_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten

1X 94_C: 30 Sekunden, 25_C: 3 Minuten, ramp to 72_C in 3 Minuten,

72_C: 2.5 Minuten

15X 94_C: 10 Sekunden, 68_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;

94_C: 10 Sekunden, 68_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;

94_C: 10 Sekunden, 29_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten

1X 72_C: 5 Minuten

[0450] Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt

[0451] Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

12X 94_C: 10 Sekunden, 64_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;

94_C: 10 Sekunden, 64_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;

94_C: 10 Sekunden, 29_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten

1X 72_C: 5 Minuten

[0452] Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 ml aufgefüllt

[0453] Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20X 94_C: 15 Sekunden, 29_C: 30 Sekunden, 72_C: 2 Minuten

1X 72_C: 5 Minuten

[0454] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (**Abb. 12**).

[0455] Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

[0456] Der pCR2.1-Klon, der das 312 by Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

Beispiel I.14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

[0457] Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

[0458] Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTAecycP, siehe Beispiel I.13) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw, der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

[0459] Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 uml Aq. Dest.

[0460] Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0461] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0462] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

[0463] Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

[0464] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43.

Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

[0465] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361 Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

[0466] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klon pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

[0467] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 by SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

[0468] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJA11 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

[0469] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 by Sall-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

[0470] Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0471] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A17 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 13**, Konstruktkarte). In der **Abb. 13** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment P-sense das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 by Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

[0472] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5C17 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 14**, Konstruktkarte).

[0473] In der **Abb. 14** beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 by Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

[0474] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CA17 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 15**, Konstruktkarte) In der **Abb. 15** beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment P-anti das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment AP3P das 771 by AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

Beispiel I.15

Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

[0475] *Tagetes* Samen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28 °C/20 bis 200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21 °C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

[0476] Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

[0477] Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5A13 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedin-

gungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD_{600} von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

[0478] Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL)) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 $\text{mMol/m}^2 \times \text{sec}$, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

[0479] Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberellinsäure GA_3 , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

[0480] Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von AgNO_3 (3-10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

[0481] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5A13 folgende Linien erhalten:
CS30-1, CS30-3 und CS30-4

Beispiel I.16:

Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

[0482] Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

[0483] Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

[0484] Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in $[\mu\text{g/g}]$ Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

[0485] Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

Beispiel II

Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

[0486] Die Blütenköpfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend werden die getrocknetgetrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

Beispiel III

Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

[0487] Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von Tagetes erecta, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petrolether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgemisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lösungsmittel/Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunkeln und in der Kühle) evaporiert.

[0488] Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunkeln und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen. Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötlich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

Beispiel IV

[0489] Herstellung von extrudiertem Forellenfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes

[0490] Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

Komponenten	(%)	Einwaage f. 500 kg
		Kg
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00

Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

[0491] Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als Komponente zugegeben.

[0492] Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprüht (Applikation durch PPA-Methode).

[0493] Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

[0494] Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.

Beispiel V

[0495] Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Forellen in einem Forellenstandardfutter- Prüfung der Biovertügbareit.

[0496] Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg Astaxanthin aus der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

[0497] Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.
- Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamtwassermenge durch Frischwasser ersetzt.
- Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsreife der Tier zu vermeiden.
- Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro Dosisstufe.
- Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu vermeiden. Das Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.
- Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.

[0498] Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Bei den verabreichten Versuchsdiäten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV hergestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch öl-gecoated wird.
- Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.
- Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeitraumes verabreicht.
- Die Fütterung erfolgt 2× täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.

[0499] Untersucht wird der Einfluß der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leistungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmassezuwachs als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.

[0500] Statisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und Lebendmassezuwachs.

[0501] Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-a-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

[0502] Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtons repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge auf.

[0503] Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

[0504] Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.

SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH Co. KGaA

<120> Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

<130> PF 54148

<160> 96

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

<223>

<400> 1	
ggcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccgggc cacagcctca	60
aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac	120
ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca	177
	Met Gln Leu Ala
	1
gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag	225
Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys	
5 10 15 20	
gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg	273
Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp	
25 30 35	
gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg	321
Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro	
40 45 50	
gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc	369
Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile	

seite 1

55	60	65	
aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His 70 75 80			417
gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp 85 90 95 100			465
ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser 105 110 115			513
ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr 120 125 130			561
ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met 135 140 145			609
aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu 150 155 160			657
tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His 165 170 175 180			705
cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly 185 190 195			753
aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met 200 205 210			801
tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln 215 220 225			849
ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala 230 235 240			897
ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro 245 250 255 260			945
cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met 265 270 275			993
aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe 280 285 290			1041
ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro 295 300 305			1089
ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg 310 315 320			1137
ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca Gly Leu Val Pro Ala			1185

325
gctgggcatg cagggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245
gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggagggggg tttgtagctg 1305
tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gagtacaccc acaggccaac 1365
acccttgacag gagatgtctt gcgtcgggag gagtgttggg cagtgtagat gctatgattg 1425
tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485
aagggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcggtgg caggcagggtg aagaggtgcg 1545
ggaggggtggt gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605
agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcattat tctttgatat 1665
agatactggt caggcaggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725
ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly

130

135

140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 325

<210> 3

<211> 1662

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (168)..(1130)

<223>

```

<400> 3
cgggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga      60
gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg      120
ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc      176
               Met His Val
               1

gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc      224
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser
               5               10               15

agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc      272
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser
20               25               30               35

gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct      320
Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro
40               45               50               55

cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc      368
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly
55               60               65               70

acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg      416
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro
70               75               80               85

aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc      464
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala
85               90               95               100

cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc      512
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe
100               105               110               115

att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac      560
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp
120               125               130               135

gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc      608
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu
135               140               145               150

ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg      656
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met
150               155               160               165

ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg      704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly
165               170               175               180

aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc      752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe
180               185               190               195

gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg      800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu
200               205               210               215

gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat      848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn
215               220               225

```

Fischfutter.ST25.txt

ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
cctgggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc	1190
ggccagtggc agcgagctgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca	1250
ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg ggggtctggca gtggctagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca	1430
gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt	1550
gttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtgggtgagag tggagtgagt	1610
gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct	1662

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His
20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr

50

55

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile
 65 70 75 80
 Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu
 85 90 95
 Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala
 100 105 110
 Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr
 115 120 125
 Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu
 130 135 140
 Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp
 145 150 155 160
 Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly
 165 170 175
 Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val
 180 185 190
 Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe
 195 200 205
 Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro
 210 215 220
 Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro
 245 250 255
 Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr
 260 265 270
 Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp
 275 280 285
 Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu
 290 295 300
 Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala
 305 310 315 320

<210> 5

Fischfutter.ST25.txt

<211> 729

<212> DNA

<213> Agrobacterium aurantiacum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 5

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg	48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu	
1 5 10 15	
atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat	96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	
20 25 30	
gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca	144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala	
35 40 45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg	192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	
50 55 60	
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat	240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn	
65 70 75 80	
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg	288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp	
85 90 95	
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc	336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr	
100 105 110	
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc	384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala	
115 120 125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc	432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro	
130 135 140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac	480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr	
145 150 155	
gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc	528
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe	
165 170 175	
gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ggc cac gac gcg ttc ccg	576
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro	
180 185 190	

Fischfutter.ST25.txt

gac	cgc	cac	aat	gcg	cgg	tcg	tcg	cgg	atc	agc	gac	ccc	gtg	tcg	ctg	624
Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Val	Ser	Leu	
		195					200					205				
ctg	acc	tgc	ttt	cac	ttt	ggc	ggt	tat	cat	cac	gaa	cac	cac	ctg	cac	672
Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Gly	Tyr	His	His	Glu	His	His	Leu	His	
	210					215					220					
ccg	acg	gtg	ccg	tgg	tgg	cgc	ctg	ccc	agc	acc	cgc	acc	aag	ggg	gac	720
Pro	Thr	Val	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr	Lys	Gly	Asp	
225					230					235					240	
acc	gca	tga														729
Thr	Ala															

<210> 6

<211> 242

<212> PRT

<213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6

Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu
1				5					10					15	
Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His
			20					25					30		
Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Ile	Ala
		35					40					45			
Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala
	50					55					60				
His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn
65					70					75					80
Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp
			85					90						95	
Arg	Lys	Met	Ile	Val	Lys	His	Met	Ala	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr
			100					105					110		
Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	Asp	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Ala
		115					120					125			
Arg	Phe	Ile	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro
	130					135					140				
Val	Ile	Val	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr
145					150					155					160

Fischfutter.ST25.txt

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7

<211> 1631

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(827)

<223>

<400> 7

ctgcaggccg ggccccggtgg ccaatggctg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

ccgggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116
Met Ser Gly Arg Lys Pro
1 5

ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164
Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile
10 15 20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212
Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp
25 30 35

gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260
Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr
40 45 50

tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308
Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly
55 60 65 70

Fischfutter.ST25.txt

tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg	356
Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu	
75 80 85	
gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tcg tgg ccc aag ctg atc gcc aag	404
Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys	
90 95 100	
cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc	452
His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe	
105 110 115	
ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat	500
Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr	
120 125 130	
ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat	548
Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr	
135 140 145 150	
gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc	596
Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val	
155 160 165	
ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg	644
Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu	
170 175 180	
ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg	692
Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg	
185 190 195	
tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc	740
Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe	
200 205 210	
ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg	788
Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp	
215 220 225 230	
cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct	837
Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala	
235 240	
cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat	897
tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc	957
gttgagagaag aacgacctct acggcgtcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac	1017
cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggcttatgg	1077
gttgatctat ttcatacctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat	1137
tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgctgcacc acgcggctga	1197
ggggcggggac cactgctga gcttcggctt catctatgcc ccaccgtgg acaagctgaa	1257
gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct	1317
gatcccggcg tggccgcag aaatccgacg tgctgctggc aggggcccggc cttgccaacg	1377
gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccacct tcgctgctg ctgctggacc	1437
gtgcggcggg cgcctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc	1497
actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt	1557

Fischfutter.ST25.txt

tcccagacca ttgcgaagg ctccgggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617
 tgcgtgcggt gacc 1631

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe
 20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu
 195 200 205

Fischfutter.ST25.txt

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly
 225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9

<211> 729

<212> DNA

<213> *Paracoccus marcusii*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 9
 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
 20 25 30
 gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
 35 40 45
 aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60
 cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80
 gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95
 cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110
 gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125
 cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc 432
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro

Fischfutter.ST25.txt

130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cat aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 225 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

<210> 10

<211> 242

<212> PRT

<213> Paracoccus marcusii

<400> 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
35 40 45Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

Fischfutter.ST25.txt
105

100

110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140
 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160
 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
 165 170 175
 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
 180 185 190
 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 11

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1629)

<223>

<400> 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
 1 5 10 15

48

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
 20 25 30

96

Fischfutter.ST25.txt

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met 35 40 45	144
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His 50 55 60	192
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln 65 70 75 80	240
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly 85 90 95	288
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys 100 105 110	336
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat ccg caa Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln 115 120 125	384
ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe 130 135 140	432
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp 145 150 155 160	480
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala 165 170 175	528
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn 180 185 190	576
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys 195 200 205	624
tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met 210 215 220	672
atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly 225 230 235 240	720
ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln 245 250 255	768
ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa ccg gta ttg gtg gaa Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu 260 265 270	816
aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac ccg Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg 275 280 285	864
gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu 290 295 300	912

Fischfutter.ST25.txt

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly 305 310 315 320	960
gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys 325 330 335	1008
atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly 340 345 350	1056
ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His 355 360 365	1104
gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala 370 375 380	1152
aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg Asn Pro Ser Leu Tyr Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met 385 390 395 400	1200
gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr 405 410 415	1248
cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr 420 425 430	1296
gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr 435 440 445	1344
gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu 450 455 460	1392
agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val 465 470 475 480	1440
tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu 485 490 495	1488
ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr 500 505 510	1536
ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg 515 520 525	1584
aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp 530 535 540	1629

<210> 12

<211> 542

<212> PRT

<213> Synechococcus sp.

<400> 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met
35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His
50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln
65 70 75 80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly
85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
115 120 125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
145 150 155 160

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
165 170 175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
180 185 190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys
195 200 205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln
245 250 255

Fischfutter.ST25.txt

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu
 260 265 270
 Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg
 275 280 285
 Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu
 290 295 300
 Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys
 325 330 335
 Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly
 340 345 350
 Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His
 355 360 365
 Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala
 370 375 380
 Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met
 385 390 395 400
 Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr
 405 410 415
 Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr
 420 425 430
 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr
 435 440 445
 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu
 450 455 460
 Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val
 465 470 475 480
 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu
 485 490 495
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr
 500 505 510
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg
 515 520 525

Fischfutter.ST25.txt

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp
 530 535 540

<210> 13

<211> 776

<212> DNA

<213> Bradyrhizobium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<223>

<400> 13
 atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48
 Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
 1 5 10 15
 gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96
 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile
 20 25 30
 atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
 35 40 45
 ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
 50 55 60
 acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240
 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
 65 70 75 80
 ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288
 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
 85 90 95
 ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336
 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
 100 105 110
 gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
 115 120 125
 ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432
 Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
 130 135 140
 ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480
 Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
 145 150 155 160
 tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528
 Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

Fischfutter.ST25.txt

165	170	175	
ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tgc gcg ctg cag ctg ttc acc			576
Leu Phe Trp Ala 180	Leu Pro Gly Leu 185	Leu Ser Ala Leu Gln 190	
ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat			624
Phe Gly Thr Tyr 195	Leu Pro His Lys 200	Pro Ala Thr Gln 205	
cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tgc ctg ctg			672
Arg His Asn Ala Arg Thr Ser 210	Glu Phe Pro Ala Trp 220	Leu Ser Leu Leu	
acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat			720
Thr Cys Phe His Phe Gly 225	Phe His His Glu 235	His His Leu His Pro Asp 240	
gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag ccg ccg gcc ctg gaa agg			768
Ala Pro Trp Trp Arg 245	Leu Pro Glu Ile Lys 250	Arg Arg Ala Leu Glu Arg 255	
cggt gac ta			776
Arg Asp			

<210> 14

<211> 258

<212> PRT

<213> Bradyrhizobium sp.

<400> 14

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
1 5 10 15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile
20 25 30

Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
35 40 45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
50 55 60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
65 70 75 80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
85 90 95

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp

115

Fischfutter.ST25.txt
120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp
195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg
245 250 255

Arg Asp

<210> 15

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 15

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
1 5 10 15

48

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
20 25 30

96

Fischfutter.ST25.txt

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu	144
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	192
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	240
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	288
ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	336
gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	384
tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	432
tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	480
tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	528
aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	576
caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	624
ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	672
tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His	720
gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile	768
tct tta taa Ser Leu	777

<210> 16

<211> 258

<212> PRT

<213> Nostoc sp.

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu
35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
245 250 255

Ser Leu

<210> 17

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(971)

<223>

<400> 17		47
ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc		
Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile		
1 5 10 15		
ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg		95
Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu		
20 25 30		
tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc		143
Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala		
35 40 45		
cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg		191
Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser		
50 55 60		
tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga		239
Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly		
65 70 75		
acc gtg cag gct gcc ggc ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca		287
Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala		
80 85 90 95		
ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa		335
Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys		
100 105 110		
cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc		383
Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly		
115 120 125		
gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac		431
Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His		
130 135 140		
atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc		479
Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu		
145 150 155		
ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat		527
Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr		

Fischfutter.ST25.txt

160	165	170	175	
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tgc cct ctg ggc tgg ctg ctg cac				575
Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	180	185	190	
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg				623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	195	200	205	
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc				671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	210	215	220	
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg				719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	225	230	235	
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg				767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	240	245	250	255
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg				815
Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	260	265	270	
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt				863
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	275	280	285	
ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att				911
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	290	295	300	
cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg				959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	305	310	315	
tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg				1011
Ser Lys Arg	320			
tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggctcg actggtctga				1071
tggccaatgg catcggccat gtctggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaagggtgatg				1131
cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc				1191
caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggg tgtgaagcaa tgactccgcc				1251
catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta				1311
gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg ttgtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg				1371
catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc				1431
agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga				1491
ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga				1551
tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa				1608
<210>	18			
<211>	322			
<212>	PRT			

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 18

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
 1 5 10 15
 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
 20 25 30
 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
 35 40 45
 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
 50 55 60
 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
 85 90 95
 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
 100 105 110
 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
 115 120 125
 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
 130 135 140
 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
 165 170 175
 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
 180 185 190
 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
 195 200 205
 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
 210 215 220
 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
305 310 315 320

Lys Arg

<210> 19

<211> 1503

<212> DNA

<213> Tomate

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 19

atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca 48
Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
1 5 10 15

cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96
His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144
His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc 192
Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa 240
Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt 288
Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
85 90 95

Fischfutter.ST25.txt																
gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att	Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile	100	105	110												336
gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg	Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val	115	120	125												384
gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg	Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp	130	135	140												432
tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat	Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His	145	150	155												480
aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg	Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met	165	170	175												528
cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata	Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	180	185	190												576
aag gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt	Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly	195	200	205												624
att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga	Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	210	215	220												672
tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct	Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	225	230	235												720
tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag	Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys	245	250	255												768
atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat	Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp	260	265	270												816
ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca	Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	275	280	285												864
ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt	Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	290	295	300												912
cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta	Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	305	310	315												960
aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt	Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	325	330	335												1008
cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt	Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	340	345	350												1056
gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg	Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	355	360	365												1104

Fischfutter.ST25.txt

gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att	1152
Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile	
370 375 380	
caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca	1200
Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr	
385 390 395 400	
gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag	1248
Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
405 410 415	
ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct	1296
Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
420 425 430	
aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg	1344
Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
435 440 445	
cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt	1392
His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe	
450 455 460	
ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata	1440
Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile	
465 470 475 480	
atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta	1488
Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu	
485 490 495	
cag gat aaa gaa tga	1503
Gln Asp Lys Glu	
500	

<210> 20

<211> 500

<212> PRT

<213> Tomate

<400> 20

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60

Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

Fischfutter.ST25.txt

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
 85 90 95
 Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
 100 105 110
 Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
 115 120 125
 Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
 130 135 140
 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
 145 150 155 160
 Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
 165 170 175
 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
 180 185 190
 Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
 195 200 205
 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
 210 215 220
 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
 225 230 235 240
 Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
 245 250 255
 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
 260 265 270
 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
 275 280 285
 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
 290 295 300
 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
 305 310 315 320
 Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
 325 330 335
 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
 340 345 350

Fischfutter.ST25.txt

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
 355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
 370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
 385 390 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
 405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
 420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
 435 440 445

His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
 450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
 465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
 485 490 495

Gln Asp Lys Glu
 500

<210> 21

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 21
 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60
 atataatatt tcaaatatatt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120
 ctgtagttta taagtgtgta tatttttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180

gttgatgtgc agctg

<210> 22

<211> 1155

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(995)

<223>

<400> 22		50
gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc		
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser		
1 5 10 15		
gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac		98
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp		
20 25 30		
gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca		146
Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser		
35 40 45		
gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc		194
Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser		
50 55 60		
gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc		242
Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala		
65 70 75		
gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg		290
Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu		
80 85 90 95		
gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt		338
Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val		
100 105 110		
agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg		386
Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu		
115 120 125		
gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat		434
Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His		
130 135 140		
ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga		482
Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg		
145 150 155		
gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc		530
Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg		
160 165 170 175		

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro
180 185 190
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe
195 200 205
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp
210 215 220
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val
225 230 235
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe
240 245 250 255
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser
260 265 270
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866
Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu
290 295 300
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg
305 310 315
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
320 325
cctgctgccca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075
gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135
tttgtagctg tcgagcttgc 1155

<210> 23

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp

35

Fischfutter.ST25.txt
40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60
 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95
 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110
 Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
 115 120 125
 Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140
 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160
 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175
 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190
 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205
 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220
 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240
 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255
 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270
 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285
 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300
 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg

305

310

Fischfutter.ST25.txt
315

320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

<210> 24

<211> 1111

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(951)

<223>

<400> 24

tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc	48
Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser	
1 5 10 15	
tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa	96
Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu	
20 25 30	
gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca	144
Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro	
35 40 45	
cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc	192
Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser	
50 55 60	
tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc	240
Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr	
65 70 75	
tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag	288
Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln	
80 85 90 95	
ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt	336
Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe	
100 105 110	
gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct	384
Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala	
115 120 125	
atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg	432
Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu	
130 135 140	
ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg	480
Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu	
145 150 155	

Fischfutter.ST25.txt

cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	528
His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	
160					165					170					175	
gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	576
Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	
				180					185					190		
agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	624
Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	
			195					200				205				
tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggc	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	672
Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	
		210					215					220				
ctg	gtg	ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	720
Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	
	225					230					235					
tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	768
Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	
240					245					250					255	
ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg	aac	tgg	tgg	aag	tcg	cgc	act	agc	cag	816
Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	
				260					265					270		
gcg	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt	ctg	acc	tgc	tac	cac	ttc	gac	ctg	cac	864
Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	
			275					280					285			
tgg	gag	cac	cgc	tgg	ccc	ttc	gcc	ccc	tgg	tgg	gag	ctg	ccc	aac		912
Trp	Glu	His	Arg	Trp	Pro	Phe	Ala	Pro	Trp	Trp	Glu	Leu	Pro	Asn		
		290				295					300					
tgc	cgc	cgc	ctg	tct	ggc	cga	ggc	ctg	gtt	cct	gcc	tag	ctggacacac			961
Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Pro	Ala					
	305					310					315					
tgcagtgggc	cctgctgcca	gctgggcatg	cagggttg	gaggactggg	tgaggtgaaa											1021
agctgcaggc	gctgctgccg	gacacgttgc	atgggctacc	ctgtgtagct	gccgccacta											1081
ggggaggggg	tttgtagctg	tcgagcttgc														1111

<210> 25

<211> 315

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser
1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu
20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro

35

Fischfutter.ST25.txt
40 45

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp
50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser
65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu
85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val
100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met
115 120 125

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly
130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His
145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp
165 170 175

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser
180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp
195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu
210 215 220

Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr
225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly
245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala
260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp
275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys
290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala

Fischfutter.ST25.txt
315

305

310

<210> 26

<211> 1031

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(1031)

<223>

<400> 26

gaagc	atg	cag	cta	gca	gcg	aca	gta	atg	ttg	gag	cag	ctt	acc	gga	agc	50
	Met	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser	
1					5					10					15	
gct	gag	gca	ctc	aag	gag	aag	gag	aag	gag	ggt	gca	ggc	agc	tct	gac	98
Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ser	Asp	
				20					25					30		
gtg	ttg	cgt	aca	tgg	gcg	acc	cag	tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca	146
Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	
			35				40						45			
gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc	194
Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	
		50					55					60				
gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gct	242
Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	
	65					70					75					
gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg	290
Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	
80					85					90					95	
gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt	338
Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	
				100					105					110		
agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	386
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	
				115				120					125			
gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	434
Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	
		130					135					140				
ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	482
Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	
	145					150					155					
gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	530
Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	
160					165				170						175	

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578
Lys His Trp Glu His 180 His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro 190
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile 200 Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe 205
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674
Met Ser 210 Tyr Met Ser Met Trp 215 Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp 220
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722
Thr Val 225 Val Met Gln Leu 230 Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val 235
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770
Phe Met Ala Ala Ala Pro 245 Ile Leu Ser Ala 250 Arg Leu Phe Tyr Phe 255
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818
Gly Thr Tyr Met Pro 260 His Lys Pro Glu Pro 265 Gly Ala Ala Ser Gly Ser 270
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866
Ser Pro Ala Val 275 Met Asn Trp Trp Lys 280 Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser 285
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914
Asp Leu Val 290 Ser Phe Leu Thr Cys 295 Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu 300
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962
His His 305 Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg 315
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca 1010
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser 335
gaa gag gat ctg aat agc tag 1031
Glu Glu Asp Leu Asn Ser 340

<210> 27

<211> 341

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Fischfutter.ST25.txt

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Fischfutter.ST25.txt

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser
 340

<210> 28

<211> 777

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 28

```

gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt      60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga      120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga      180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta      240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta      300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca      360
tatatatctc tttcttctta tttcccaa ataacagacaa aagtagaata ttggctttta      420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca      480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt      540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta      600
tcaacttagt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt      660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact      720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaadc tcttcaacaa aaagctt      777

```

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 29
gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 30
gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 31
tgcattgctag aggcactcaa ggagaaggag

30

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(59)

<223>

<400> 32

ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 33

gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 34

<211> 37

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 34

cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 35
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 36
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 37

<211> 212

<212> DNA

<213> Kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(212)

<223>

<400> 37
gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta

60

Fischfutter.ST25.txt

gtagtaatat aatattttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata actttttctaa tatatgacca 180
aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

<210> 38
<211> 1830
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> CDS
<222> (141)..(1691)
<223>

<400> 38
ggcacgagggc aaagcaaagg ttgtttggtg ttgtttgtga gagacactcc aatccaaaca 60
gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120
agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
1 5 10
atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr
15 20 25
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln
30 35 40
gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tgc gag ctg 317
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu
45 50 55
ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc 365
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser
60 65 70 75
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt 413
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser
80 85 90
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt 461
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu
95 100 105
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc 509
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile
110 115 120
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa 557
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu
125 130 135

Fischfutter.ST25.txt

ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp 140 145 150 155	605
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala 160 165 170	653
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg 175 180 185	701
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile 190 195 200	749
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile 205 210 215	797
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly 220 225 230 235	845
aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr 240 245 250	893
gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser 255 260 265	941
cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln 270 275 280	989
tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser 285 290 295	1037
cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala 300 305 310 315	1085
atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr 320 325 330	1133
atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile 335 340 345	1181
cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe 350 355 360	1229
ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val 365 370 375	1277
aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile 380 385 390 395	1325
tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr 400 405 410	1373

Fischfutter.ST25.txt

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421
 Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg
 415 420 425

aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469
 Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln
 430 435 440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu
 445 450 455

ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr
 460 465 470 475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly
 495 500 505

aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcatcag 1711
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile
 510 515

tttagattat aggcacatct tgcataatata tatgtataaaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771

tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

<210> 39

<211> 516

<212> PRT

<213> Tagetes erecta

<400> 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
 1 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys
 20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu
 35 40 45

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met
 50 55 60

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu
 65 70 75 80

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp
 85 90 95

Fischfutter.ST25.txt

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu
 100 105 110
 Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro
 115 120 125
 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly
 130 135 140
 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu
 145 150 155 160
 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser
 165 170 175
 Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly
 180 185 190
 Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn
 195 200 205
 Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg
 210 215 220
 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
 225 230 235 240
 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu
 245 250 255
 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met
 260 265 270
 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln
 275 280 285
 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe
 290 295 300
 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile
 325 330 335
 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser
 340 345 350
 Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser
 355 360 365

Fischfutter.ST25.txt

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu
 370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn
 385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp
 450 455 460

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe
 465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu
 485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile
 515

<210> 40

<211> 445

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(445)

<223>

<400> 40

aagcttgac gaggcaaagc aaaggttggt tgtgttggt gttgagagac actccaatcc	60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatattc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa	120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat	180

Fischfutter.ST25.txt

```

ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatagca cagaataagt ccatggatgc 360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

```

<210> 41
 <211> 446
 <212> DNA
 <213> *Tagetes erecta*

<220>
 <221> Antisense Fragment
 <222> (1)..(446)
 <223>

```

<400> 41
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatagca cagaataagt ccatggatgc 360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg gaccc 446

```

<210> 42
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> *Tagetes erecta*

<220>
 <221> Sense Fragment
 <222> (1)..(393)
 <223>

Fischfutter.ST25.txt

```

<400> 42
aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg      60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggttt cttggatctt cgttatcatc      120
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat      180
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct      240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata      300
tatgtataaa ctttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct      360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac                                     393

```

```

<210> 43
<211> 397
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

```

```

<220>
<221> Antisense Fragment
<222> (1)..(397)
<223>

```

```

<400> 43
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgagggggacc cgcacattct      60
tccggacttt ctccgcttg cccacatgga tgtgggtggg gtttcttgga tcttcgttat      120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga      180
gaatgggtct ggttagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt      240
atctcacgat ataaataact ctagtgcga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata      300
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat      360
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc                                     397

```

```

<210> 44
<211> 1537
<212> DNA
<213> -

```

```

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1537)

```

<223>

<400> 44

```

gagctctaca aattagggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt      60
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcactttct tattcatacc      120
tattcactca agcctttacc atcttctttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt      180
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc      240
caaatctcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt      300
aatacaataa aagtgaacaa aaatatctat aaataaacia atatatatat tttgttagac      360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg      420
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc      480
taaaccctat ttaaatagtt aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt      540
taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt      600
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtc taacatagtc taaaattcaa acatccacat      660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tatttattta aataaaaaag actaataaat      720
atataaaatg aatgttcata cgcagaccca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga      780
gattattttt aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca      840
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat      900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg      960
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcaaaagg tcaatagtca     1020
atattagggtt ttattggact ttaatatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat     1080
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca     1140
cgaaagcgta ttgtgtattc attcattttg cgctcacat gcttcggttg gctcgcttta     1200
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta     1260
acaagccacg ttgctgtcca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg     1320
acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcgaaga tcaagggtat aatcgtcttt     1380
ttgaattcta tttctcttta ttaatatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt     1440
taaaacgtag ctgctgttta agtaaattcc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt     1500
gtttctctga ttacggaat ttggaaataa taagctt                                     1537

```

<210> 45

<211> 734

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> variation

<222> (1)..(734)

<223>

<400> 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc	60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc	120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cgggtggatcg	180
gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc	240
caaaaggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat	300
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc	360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttggggaggtg ggggattata ggctttgttg	420
tgagaatgtt gagaaagagg tttagacaaat cgggtgttga atgaggttaa atggagtta	480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatgatggg gatattaaag acggscaata	540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct	600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta	660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgtgtgtgt tgagagacac tccaatccaa	720
acagatacaa ggcg	734

<210> 46

<211> 280

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

<400> 46

gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat	60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaac acatacaacg	120
tggctttaa agatggcttg gctgctaatac aactcaactc aactcatatc ctatccattc	180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttggtgt	240

tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga

280

<210> 47

<211> 358

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

<223>

<400> 47	
aagcttaccg atagtaaaat cgttagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag	60
gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgaggttaaa	120
tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga	180
cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa	240
aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat	300
tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttggtt ttgtcgac	358

<210> 48

<211> 361

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Promotor

<222> (1)..(361)

<223>

<400> 48	
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta	60
taggcctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgagggt	120
aaatggagtt taattaaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggtgatg gggatattaa	180
agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt	240
taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc	300

Fischfutter.ST25.txt

aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgatc 360

c 361

<210> 49

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 49

gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 50

<211> 37

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 50

cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 51

<211> 34

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 51
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 52
taagcttttt gttgaagaga ttg

25

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 53
gaaaatactt catcagcatt acc

23

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 54
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 55
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 56
aagcttgac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 57
gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 58
aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 59
gaattcgcac gagggcaaagc aaagggttg

28

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 60
aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 61
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 62

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 62
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(27)
<223>

<400> 63
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 64
cgccttgtat ctgtttggat tgg

23

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(24)
<223>

<400> 65
ctaacaatca atgagtatga gagc

24

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 66
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

<210> 67

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 67
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 68
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 69

<211> 15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 69
gtcgagtatg gagtt

15

<210> 70

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 70
aagcttaccg atagtaaaat cgttagtt

28

<210> 71

<211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 71

ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<400> 72

gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 73

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 73

ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 74
gtcgcactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 75
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 76
gagctctaca aattagggtt ac

22

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 77

aagcttatta tttccaaatt ccg

23

<210> 78

<211> 50

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(50)

<223>

<400> 78

aagcttttgca attcatagag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag

50

<210> 79

<211> 1062

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (32)..(1021)

<223>

<400> 79

aagcttttgca attcatagag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val
 1 5

52

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag
 Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu
 10 15 20

100

aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag
 Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln
 25 30 35

148

Fischfutter.ST25.txt																
tac Tyr 40	tcg Ser	ctt Leu	ccg Pro	tca Ser	gag Glu 45	gag Glu	tca Ser	gac Asp	gcg Ala 50	gcc Ala	cgc Arg	ccg Pro	gga Gly	ctg Leu	aag Lys 55	196
aat Asn	gcc Ala	tac Tyr	aag Lys	cca Pro 60	cca Pro	cct Pro	tcc Ser	gac Asp	aca Thr 65	aag Lys	ggc Gly	atc Ile	aca Thr	atg Met 70	gcg Ala	244
cta Leu	gct Ala	gtc Val	atc Ile 75	ggc Gly	tcc Ser	tgg Trp	gcc Ala	gca Ala 80	gtg Val	ttc Phe	ctc Leu	cac His	gcc Ala 85	att Ile	ttt Phe	292
caa Gln	atc Ile	aag Lys 90	ctt Leu	ccg Pro	acc Thr	tcc Ser	ttg Leu 95	gac Asp	cag Gln	ctg Leu	cac His	tgg Trp 100	ctg Leu	ccc Pro	gtg Val	340
tca Ser	gat Asp 105	gcc Ala	aca Thr	gct Ala	cag Gln	ctg Leu 110	gtt Val	agc Ser	ggc Gly	agc Ser	agc Ser 115	agc Ser	ctg Leu	ctg Leu	cac His	388
atc Ile 120	gtc Val	gta Val	gta Val	ttc Phe	ttt Phe 125	gtc Val	ctg Leu	gag Glu	ttc Phe	ctg Leu 130	tac Tyr	aca Thr	ggc Gly	ctt Leu	ttt Phe 135	436
atc Ile	acc Thr	acg Thr	cat His	gat Asp 140	gct Ala	atg Met	cat His	ggc Gly	acc Thr 145	atc Ile	gcc Ala	atg Met	aga Arg	aac Asn 150	agg Arg	484
cag Gln	ctt Leu	aat Asn	gac Asp 155	ttc Phe	ttg Leu	ggc Gly	aga Arg	gta Val 160	tgc Cys	atc Ile	tcc Ser	ttg Leu	tac Tyr 165	gcc Ala	tgg Trp	532
ttt Phe	gat Asp 170	tac Tyr	aac Asn	atg Met	ctg Leu	cac His	cgc Arg 175	aag Lys	cat His	tgg Trp	gag Glu 180	cac His 180	cac His	aac Asn	cac His	580
act Thr	ggc Gly 185	gag Glu	gtg Val	ggc Gly	aag Lys	gac Asp 190	cct Pro	gac Asp	ttc Phe	cac His	agg Arg 195	gga Gly	aac Asn	cct Pro	ggc Gly	628
att Ile 200	gtg Val	ccc Pro	tgg Trp	ttt Phe	gcc Ala 205	agc Ser	ttc Phe	atg Met	tcc Ser	agc Ser 210	tac Tyr	atg Met	tcg Ser	atg Met	tgg Trp 215	676
cag Gln	ttt Phe	gcg Ala	cgc Arg	ctc Leu 220	gca Ala	tgg Trp	tgg Trp	acg Thr	gtg Val 225	gtc Val	atg Met	cag Gln	ctg Leu	ctg Leu 230	ggt Gly	724
gcg Ala	cca Pro	atg Met	gcg Ala 235	aac Asn	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val	ttc Phe 240	atg Met	gcg Ala	gcc Ala	gcg Ala	ccc Pro 245	atc Ile	ctg Leu	772
tcc Ser	gcc Ala	ttc Phe 250	cgc Arg	ttg Leu	ttc Phe	tac Tyr	ttt Phe 255	ggc Gly	acg Thr	tac Tyr	atg Met	ccc Pro 260	cac His	aag Lys	cct Pro	820
gag Glu	cct Pro 265	ggc Gly	gcc Ala	gcg Ala	tca Ser	ggc Gly 270	tct Ser	tca Ser	cca Pro	gcc Ala	gtc Val 275	atg Met	aac Asn	tgg Trp	tgg Trp	868
aag Lys 280	tcg Ser	cgc Arg	act Thr	agc Ser	cag Gln 285	gcg Ala	tcc Ser	gac Asp	ctg Leu	gtc Val 290	agc Ser	ttt Phe	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys 295	916
tac Tyr	cac His	ttc Phe	gac Asp	ctg Leu 300	cac His	tgg Trp	gag Glu	cac His 305	cac His	gcg Arg	tgg Trp	ccc Pro	ttt Phe	gcc Ala 310	ccc Pro	964

Fischfutter.ST25.txt

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val
 315 320 325

cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062
 Pro Ala

<210> 80

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Fischfutter.ST25.txt

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 325

<210> 81

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 81

ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa	48
Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln	
1 5 10 15	

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta	96
Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val	
20 25 30	

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat	144
Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn	

Fischfutter.ST25.txt

35	40	45	
tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60			192
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80			240
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95			288
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110			336
aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115 120 125			384
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140			432
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160			480
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175			528
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190			576
ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205			624
ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220			672
gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240			720
gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255			768
aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260			789

<210> 82

<211> 262

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 82

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 35 40 45
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60
 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 85 90 95
 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125
 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
 130 135 140
 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
 145 150 155 160
 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
 165 170 175
 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
 180 185 190
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
 195 200 205
 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
 210 215 220
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
 225 230 235 240
 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
 245 250 255
 Asn Ser Val Thr Asn Ser

260

<210> 83
 <211> 762
 <212> DNA
 <213> Nostoc punctiforme

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(762)
 <223>

<400> 83
 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
 1 5 10 15
 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
 20 25 30
 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
 35 40 45
 atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
 50 55 60
 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
 65 70 75 80
 ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
 85 90 95
 ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
 100 105 110
 aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384
 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
 115 120 125
 ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432
 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
 130 135 140
 atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480
 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
 145 150 155 160
 tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act 528
 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
 165 170 175

Fischfutter.ST25.txt

tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576
Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
			180					185					190			
ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	ggt	cag	624
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
		195					200					205				
cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
		210				215					220					
acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
		225			230					235					240	
att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
				245					250							

<210> 84

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 84

Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro	
1				5					10					15		
Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	
			20					25					30			
Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	
		35					40					45				
Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln	
	50					55					60					
Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His	
	65				70					75					80	
Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr	
				85					90					95		
Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	
			100					105					110			
Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	
		115					120					125				
Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	
	130					135					140					

Fischfutter.ST25.txt

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

<210> 85

<211> 804

<212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 85

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac 48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc 96
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc 144
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg 192
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg 240
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu

Fischfutter.ST25.txt

65	70	75	80	
ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat				288
Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His	85	90	95	
ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca				336
Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala	100	105	110	
ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg				384
Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu	115	120	125	
gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac				432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn	130	135	140	
aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg				480
Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met	145	150	155	
cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc				528
Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu	165	170	175	
aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc				576
Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser	180	185	190	
gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc				624
Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr	195	200	205	
tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg				672
Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr	210	215	220	
cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac				720
Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn	225	230	235	
ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt				768
Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe	245	250	255	
cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga				804
Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr	260	265		

<210> 86

<211> 267

<212> PRT

<213> Synechococcus WH8102

<400> 86

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
 1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
260 265

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 87
gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

33

<210> 88

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 88
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac cat

33

<210> 89

<211> 805

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 89
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtgt
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatattt attgcctgct

60

120

Fischfutter.ST25.txt

ttatcttatt	tttatgggca	attagtttaa	tcttattact	ctcaatagat	acatccataa	180
ttcataagag	cttattaggt	atagccatgc	tttggcagac	cttcttatat	acaggtttat	240
ttattactgc	tcatgatgcc	atgcacggcg	tagtttatcc	caaaaatccc	agaataaata	300
attttatagg	taagctcact	ctaactttgt	atggactact	cccttataaa	gattttattga	360
aaaaacattg	gttacaccac	ggacatcctg	gtactgattt	agaccctgat	tattacaatg	420
gtcatcccca	aaactttctt	ctttggatat	tacattttat	gaagtcttat	tggcgatgga	480
cgcaaatfff	cggattagtg	atgatttttc	atggacttaa	aaatctggtg	catataccag	540
aaaataatff	aatttatatf	tggatgatac	cttctatfff	aagttcagta	caactatfff	600
atfffgttac	atfffgtcct	cataaaaagc	tagaaggtgg	ttatactaac	ccccattgtg	660
cgcgcagtat	cccattacct	cttttttggt	cttttgttac	ttgttatcac	ttcggctacc	720
acaaggaaca	tcacgaatac	cctcaacttc	cttggtggaa	attacctgaa	gctcacaaaa	780
tatctttata	aggtctagag	catgc				805

<210> 90

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 90

gagctcttca ttatttcgat ttigatttcg tgacc

35

<210> 91

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(44)

<223>

<400> 91
aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact

44

<210> 92

<211> 653

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

<223>

<400> 92
gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttgttgtg 60
taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt 120
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat 180
ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa 240
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggagggg tgactccatg tcaaaataga 300
tgtcataaga ggcccatcaa taagtgcttg agcccattag ctagcccagt aactaccaga 360
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt tttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag 420
gcgcatgaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact 480
tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatc 540
tcccgcataat ctttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga 600
tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt 653

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 93
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 94
aagcttgagc tctttgttga agagatttgg

30

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 95
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

34

<400> 96
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Eidotter.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen

oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.

18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

```
KETO2.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGAOCTGTTGC 10C
X86782.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGAOCTGTTGC 10C

KETO2.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTCGCTTCGCTCAGAGAGTCAAGCGCGCCGCCCGGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCOGACACAAAGGG 20C
X86782.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTCGCTTCGCTCAGAGAGTCAAGCGCGCCGCCCGGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCOGACACAAAGGG 20C

KETO2.seq CATCAAAATGGCGCTAGCTGTATCGGCTCCTGGGCGCAGTGTCTCTCCAGGCCATTTTCAAATCAAGCTTCOGACCTCCTTGGAOCAGCTGCACTGG 30C
X86782.seq CATCAAAATGGCGCTAGCTGTATCGGCTCCTGGGCGCAGTGTCTCTCCAGGCCATTTTCAAATCAAGCTTCOGACCTCCTTGGAOCAGCTGCACTGG 30C

KETO2.seq CTGCCCGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGAGCTGCTGCACATCGTGTAGTATTCTTTGTCCTGGAGTTCTGTACACAGGCC 40C
X86782.seq CTGCCCGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGAGCTGCTGCACATCGTGTAGTATTCTTTGTCCTGGAGTTCTGTACACAGGCC 40C

KETO2.seq TTTTATACCAACGATGATGCTATGATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGACGCCCTG 50C
X86782.seq TTTTATACCAACGATGATGCTATGATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGACGCCCTG 50C

KETO2.seq GTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCACCACAACCACTGGCGAGGTGGCAAGGACCTGACTTCCACAGGGGAACCTGGCATT 60C
X86782.seq GTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCACCACAACCACTGGCGAGGTGGCAAGGACCTGACTTCCACAGGGGAACCTGGCATT 60C

KETO2.seq GTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCGCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGGCCAA 70C
X86782.seq GTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCGCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGGCCAA 70C

KETO2.seq TGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGGGCGCGGCCCATCTGTCCGCTTCGGCTTGTTCCTACTTTGGCACGTACATGCCCAAGGCTGAGCCTGGCGC 80C
X86782.seq TGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGGGCGCGGCCCATCTGTCCGCTTCGGCTTGTTCCTACTTTGGCACGTACATGCCCAAGGCTGAGCCTGGCGC 80C

KETO2.seq CGCGTCAGGCTCTTCACAGCGCTCATGAACGGTGGAAAGTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGAOCTGCTACCACTTCGACCTG 90C
X86782.seq CGCGTCAGGCTCTTCACAGCGCTCATGAACGGTGGAAAGTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGAOCTGCTACCACTTCGACCTG 90C

KETO2.seq CACTGGGAGCACACCGCTGGGCCCTTGGGCCCTGGTGGGAGCTGCCCACTGGCGCGGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCTCTGCCTAG 99C
X86782.seq CACTGGGAGCACACCGCTGGGCCCTTGGGCCCTGGTGGGAGCTGCCCACTGGCGCGGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCTCTGCCTAG 99C
```

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

```

KETO2.pro  MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA 50
X86782.pro  MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA 50

KETO2.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 10
X86782.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 10

KETO2.pro  L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 15
X86782.pro  L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 15

KETO2.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 20
X86782.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 20

KETO2.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 25
X86782.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 25

KETO2.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 30
X86782.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 30

KETO2.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 32
X86782.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 32

```

Abbildung 3:

Konstrukt zur Überexpression des Ketolase
(b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit
rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des
d35S-Promoters (Tagetesttransformationskonstrukt)

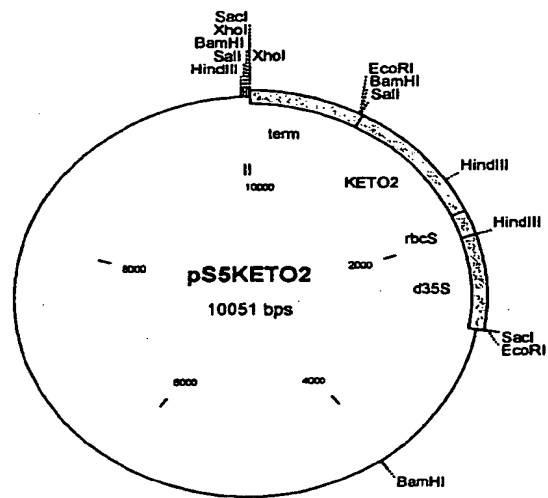


Abbildung 4:

Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt) .

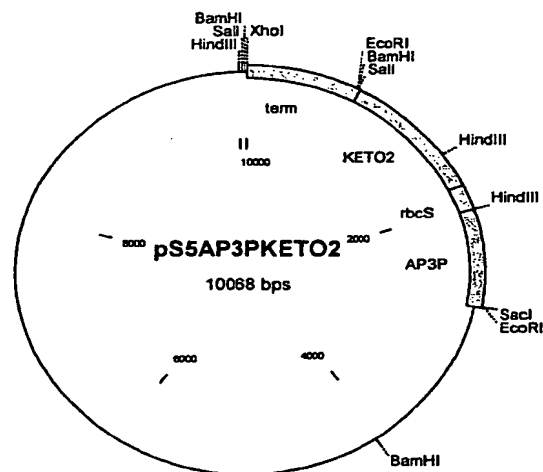


Abbildung 5

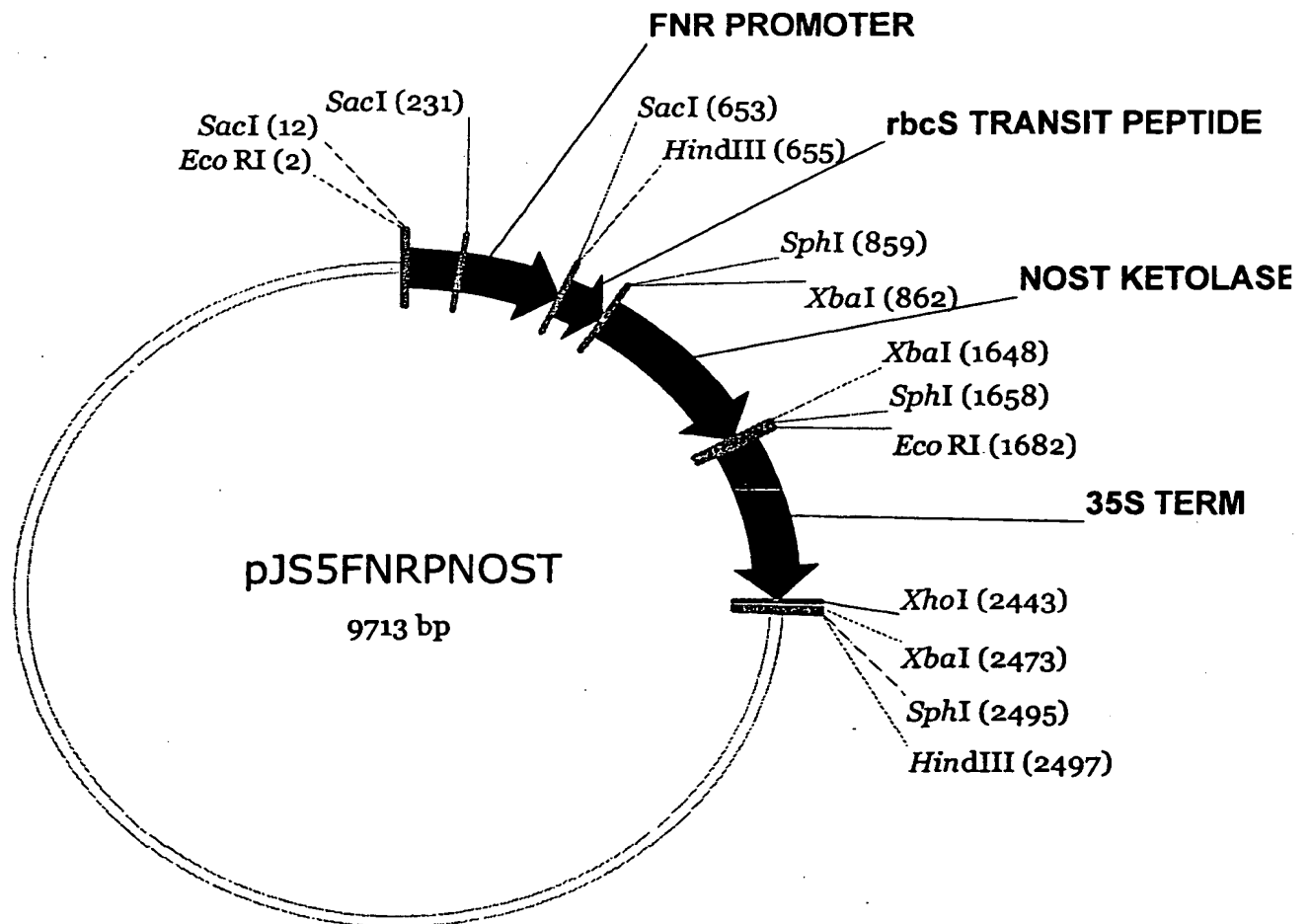


Abbildung 6

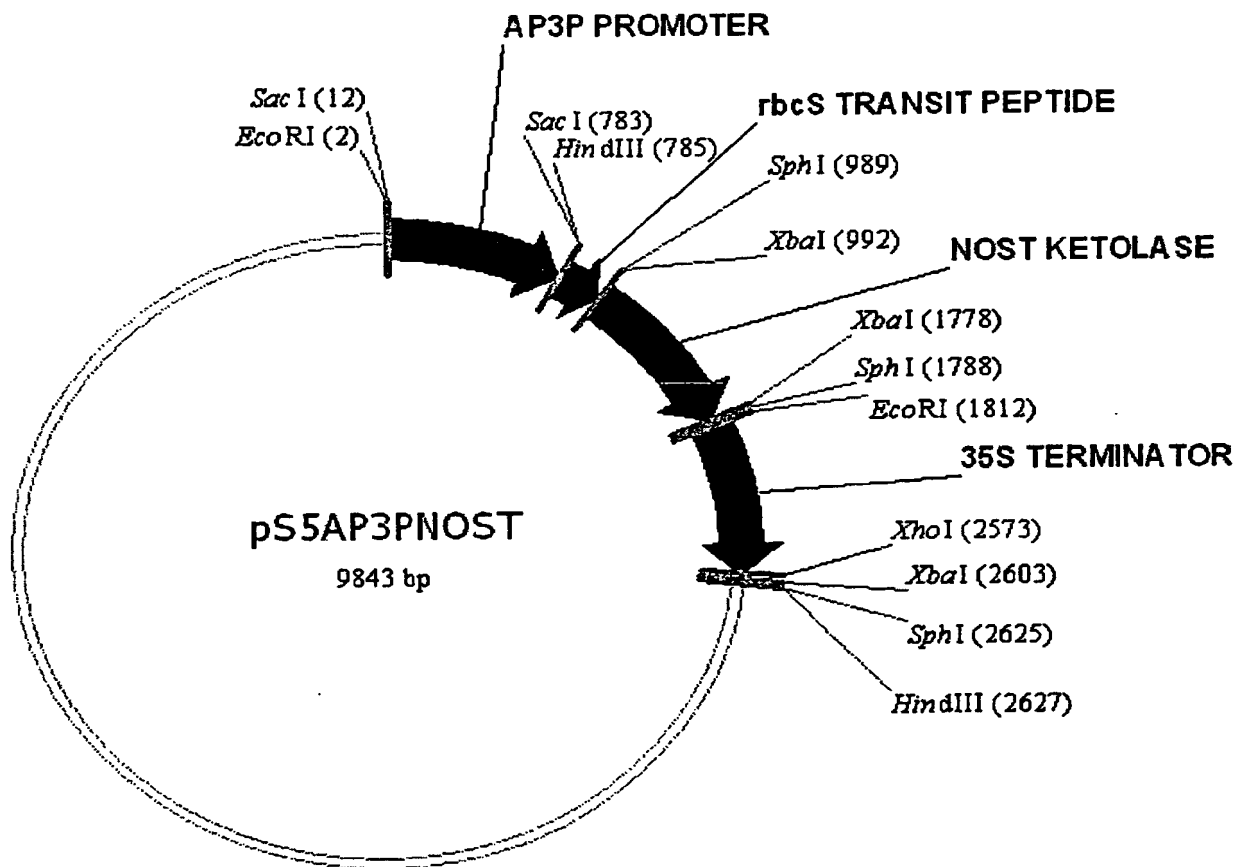


Abbildung 7: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

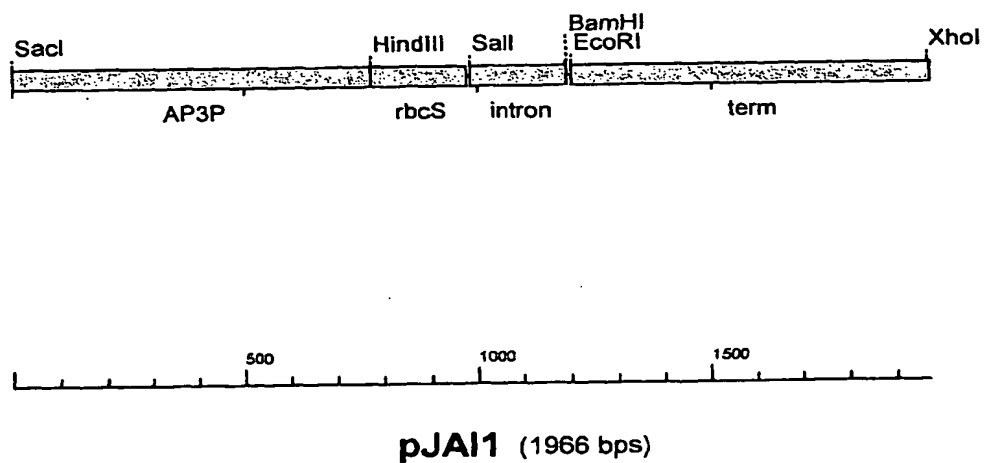


Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

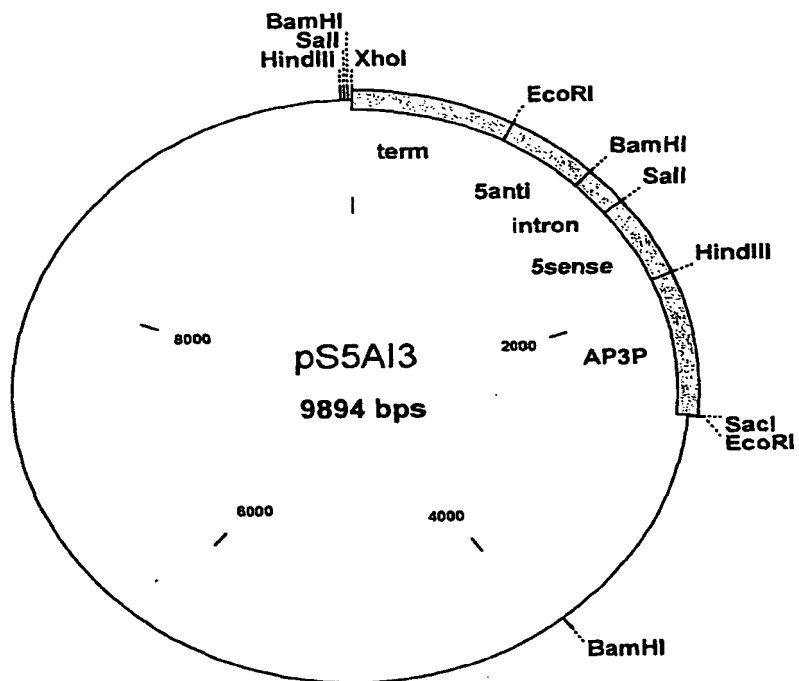


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend
5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA
(AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

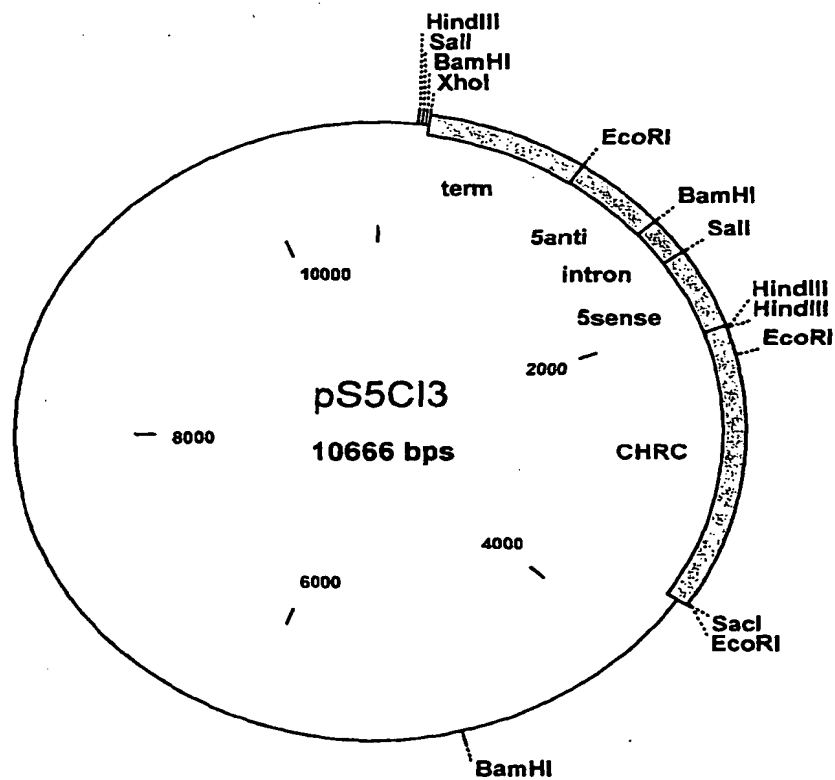


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

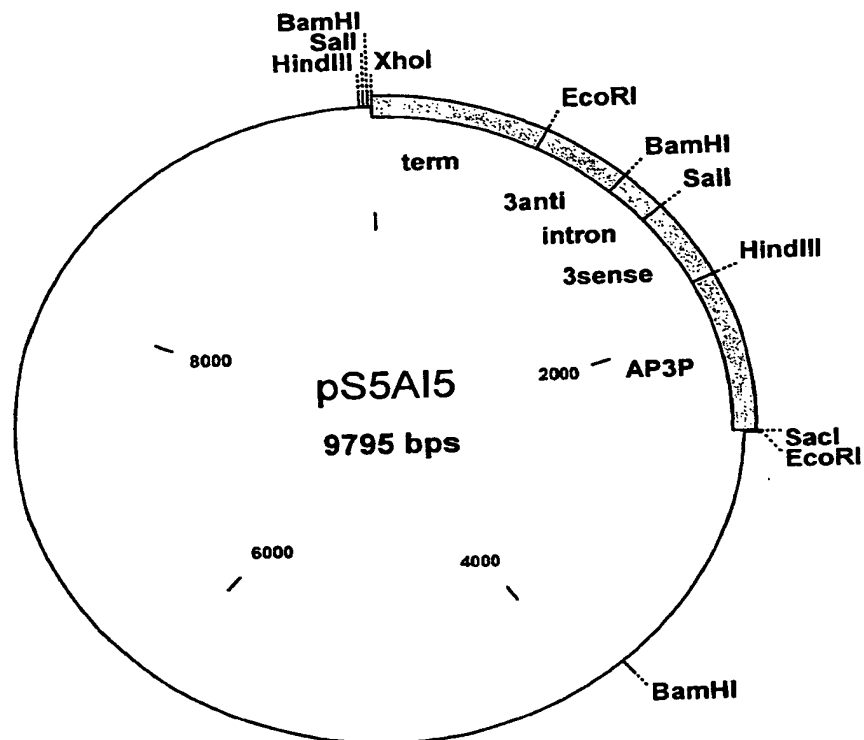


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

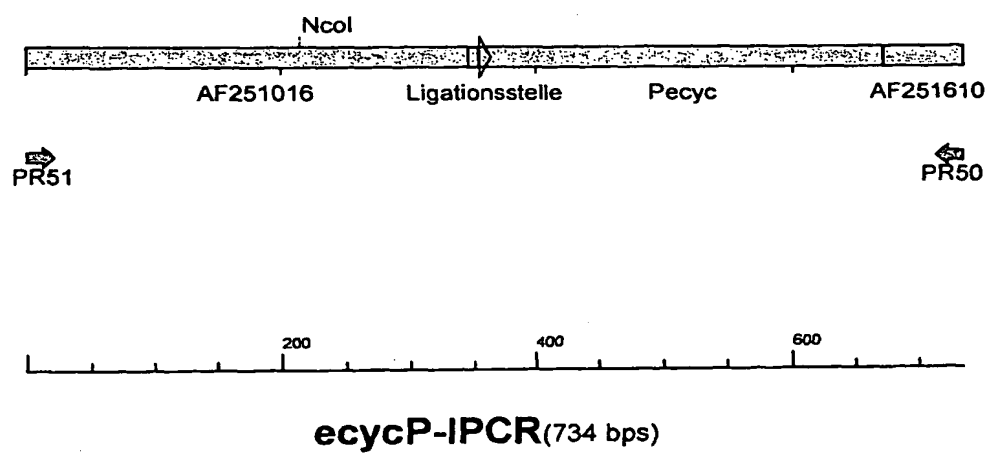


Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

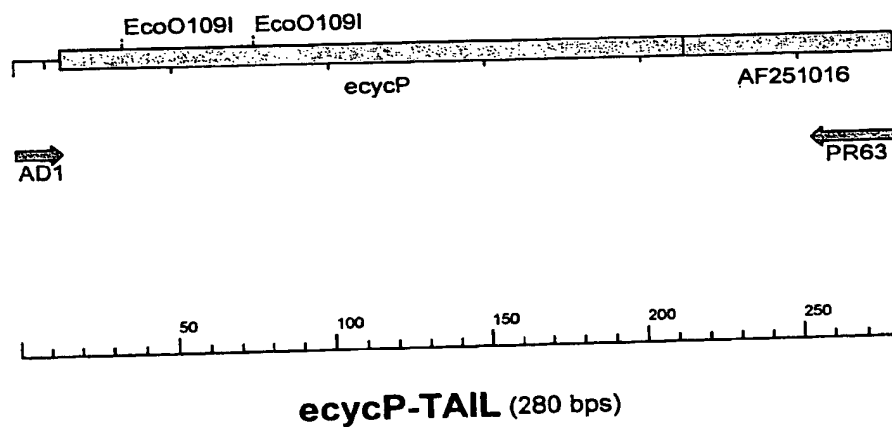


Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

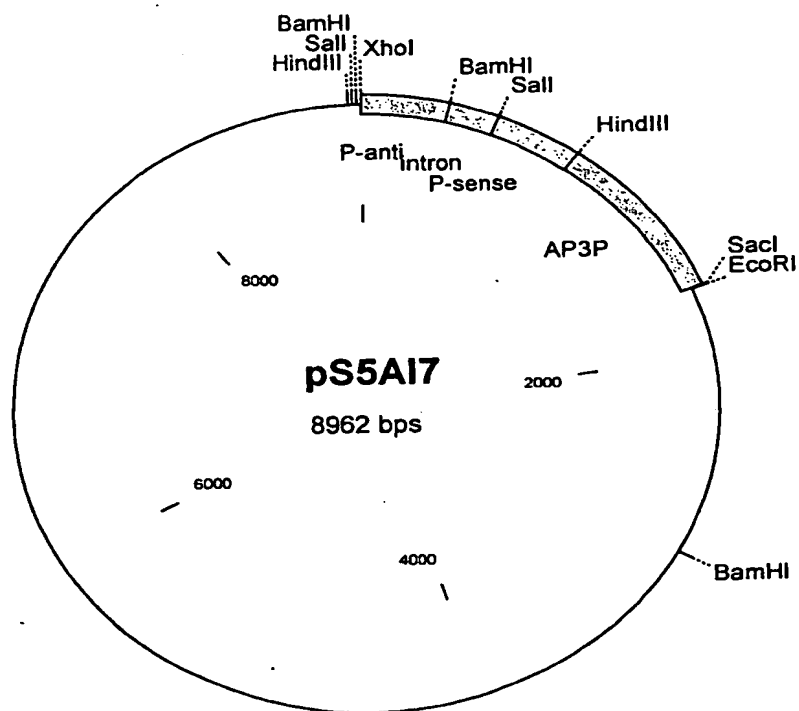


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

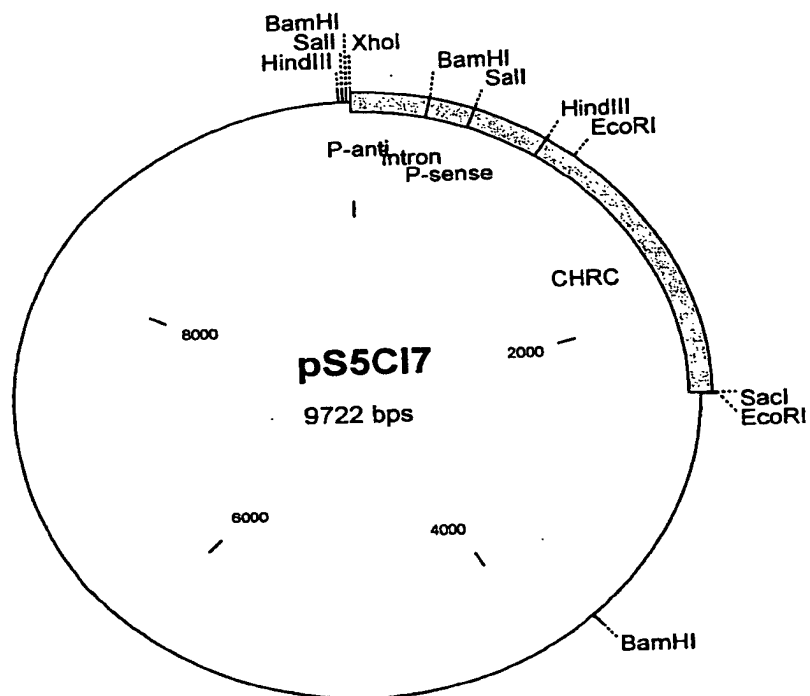
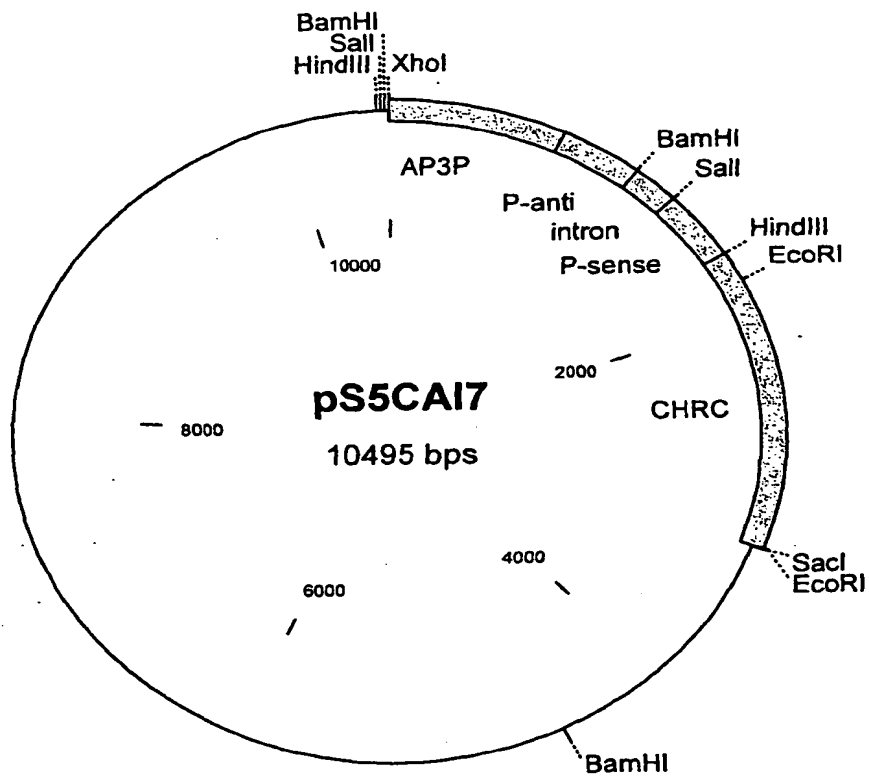


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)